

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro

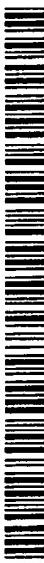


(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. März 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/18545 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/68**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE00/03071**
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
1. September 2000 (01.09.2000)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:  
199 43 743.2 3. September 1999 (03.09.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **JERINI BIO TOOLS GMBH [DE/DE]; Rudower Chaussee 29, 12489 Berlin (DE).**
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **KRAUSE, Eberhard [DE/DE]; Klutstrasse 26, 12587 Berlin (DE). BITTORF, Thomas [DE/DE]; Birkenallee 5, 18184 Sagerheide (DE). SCHNEIDER-MERGENER, Jens [DE/DE]; Hohenzollerndamm 7, 10717 Berlin (DE).**
- (74) Anwalt: **SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, 10119 Berlin (DE).**



(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING BINDING PARTNERS WITH POSITION-SPECIFIC ARRAYS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON BINDUNGSPARTNERN MIT POSITIONS-SPEZIFISCHEN ARRAYS

**WO 01/18545 A2**

(57) Abstract: Disclosed is a method for identifying binding partners with position-specific arrays by means of mass spectrometry. A position-specific ligat array is produced on a carrier material by means of small volumes which are position-specifically mounted and belong to reaction partners. At least two successive reactions are carried out gradually. The position-specific ligat array that is fixed to the carrier material is incubated with a mixture of ligands. Ligands that are not bound to the ligat array are subsequently removed and the ligand/s that is/are bound to the ligat array are further characterised by means of mass spectrometry.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben ist ein Verfahren zur massenspektrometrischen Identifizierung von Bindungspartnern mit positionsspezifischen Arrays, wobei man auf einem Trägermaterial mittels positionsspezifisch aufgebrachter kleiner Volumina von Reaktionspartnern ein positionsspezifischer Ligat-Array herstellt, wobei man schrittweise mindestens zwei aufeinander folgende Reaktionen ausführt, das auf dem Trägermaterial fixierte positionsspezifische Ligat-Array mit einem Gemisch von Liganden inkubiert, anschließend nicht an das Ligat-Array gebundene Liganden entfernt und der/die an das Ligat-Array gebundene/n Ligand/en weiter mittels Massenspektrometrie charakterisiert.

**Verfahren zur Identifizierung von Bindungspartnern mit  
positions-spezifischen Arrays**

- 5     Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur massenspektrometrischen Identifizierung von Bindungspartnern mit positions-spezifischen Arrays.

Mit der fortschreitenden Entschlüsselung des menschlichen  
10 Genoms wird es mehr und mehr offensichtlich, daß die  
Funktion von Genen sowie das Verhalten von Genprodukten  
sehr schwierig oder in den meisten Fällen unmöglich vor-  
herzusagen ist. Aus diesem Grund wird es immer wichtiger,  
15 Verfahren zu entwickeln, um die Funktion von Genen zu er-  
mitteln. Die Funktion setzt sich dabei im wesentlichen  
aus dem dynamischen Auftreten und Verschwinden der Pro-  
teine und ihre Interaktion mit Liganden zusammen, die in  
der Mehrzahl ebenfalls Proteine darstellen. Die Regulati-  
on der Funktion von Proteinen ist ein extrem komplizier-  
ter Prozeß, der auf verschiedenen Ebenen beeinflußt wird,  
20 so z.B. durch posttranskriptionale Modifikationen, ihre  
Halbwertszeiten, Kompartimentierung, aber auch dynami-  
schen Veränderungen der Tertiärstruktur. Die Untersuchung  
der Funktion und der Interaktionen aller Proteine inner-  
halb einer Zelle wird „Proteomics“ genannt (Dove, 1999;  
25 Hochstrasser, 1998), die Gesamtheit aller Proteine einer  
Zelle wird als „Proteom“ bezeichnet. Dieses Forschungsge-  
biet wird einen enormen Einfluß auf die Identifizierung  
von Wirkstoffzielen, Wirkstoffzuschnitt und Wirkstoffent-  
30 deckung haben.

Die zur Darstellung des Proteoms einer Zelle derzeit fast ausschließlich verwendete Methode ist die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE). Die Proteine werden in der ersten Dimension durch eine isoelektrische Fokussierung getrennt. Eine dazu orthogonal ausge-

führte SDS-Elektrophorese bildet die zweite Dimension. Diese Methode ermöglicht heute die Analyse tausender Proteine aus einem zweidimensionalen Gel innerhalb einiger Tage. Inzwischen ist man sich jedoch der Tatsache bewußt,  
5 daß es schwierig ist, mehr als 50 bis 60 Prozent eines Proteoms auf einem einzelnen 2D-Gel aufzutrennen, was an den sehr unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften der zellulären Proteine liegt. Des weiteren kommen die meisten zellulären Proteine in sehr geringen  
10 Mengen in der Zelle vor.

Zu einer weiteren Analyse wird das im 2D-Gel aufgetrennte und als Bande oder Spot isolierte Protein vor seiner Elution aus der Matrix meist proteolytisch verdaut. Dazu muß die Matrix des Gels geschrumpft werden und die Bedingungen im Gel für den Verdau geeignet sein. Der Verdau dauert zudem mehrere Stunden.  
15

Blüggel und Immmer (Biospektrum 5/98, S. 39-44) beschreiben im Anschluß an die oben genannten Verfahrensschritte eine weitere Charakterisierung von Peptid Fragmentspektrien mittels Massenspektrometrie. Diese nur für die Analyse eines einzelnen Proteinspots geeignete Methode ist jedoch sehr umständlich und immer noch weit von den für  
20 die effektive Analyse geforderten Automatisierungsgraden entfernt.  
25

Ein Schlüsselaspekt bei Proteomics und Wirkstofffindung ist die Identifizierung von Signalkaskaden (pathways) in Zusammenhang mit Rezeptor-Ligand-Interaktion-vermittelter  
30 Stimulierung von Zellen. Diese Signalkaskaden beinhalten Kaskaden von Protein-Protein-Interaktionen, die lediglich nichtkovalente physikalische Interaktionen von Netzwerkproteinen, aber auch Kontakte enzymatischen Typs, wie  
35 Phosphorylierung, Dephosphorylierung oder proteolytische Interaktionen sein können.

Die im Augenblick vorhandene Methode der Wahl zur Identifizierung von zellulären interagierenden Partnern ist das „two-hybrid“ Screeningsystem in Hefe (z.B. Colas und Brent, TIBTECH 1998, 16 S. 355-363). Dieser in vitro Ansatz führt jedoch oftmals zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen.

Die US 5,821,047 beschreibt einen weiteren aktuellen Ansatz zur Identifizierung von zellulären interagierenden Partnern, das sogenannte „phage display“. Das Verfahren umfaßt die Fusion eines zu untersuchenden Proteins an die carboxyterminale Domäne des Gen III coat Proteins des filamentösen Phagen M13. Mit diesem auf der Oberfläche des Phagen M13 präsentierten Fusionsprotein wird dann nach neuen Liganden des zu untersuchenden Proteins gescreent.

Eine weitere interessante und sich verbreitende Technik ist die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biomolekular-Interaktionsanalyse Massenspektrometrie (BIA/MS) (Nelson und Krone, 1999). Es bleibt abzuwarten, wie sich dieser Ansatz im Hinblick auf Signifikanz der Daten als auch auf nötige Automatisierung als praktikabel erweisen wird.

Dazu werden auf Cellulosemembranen mit der sogenannten „Spot-Synthesetechnik“ synthetisierte Peptide verwendet, um molekulare Erkennungsergebnisse zu untersuchen.

Alle oben beschriebenen Verfahren zur Analyse des Proteoms und der Untersuchung im Bereich der Proteomics weisen erhebliche Nachteile auf. Sie sind experimentell aufwendig und zeitintensiv und erfassen bei der Analyse nicht alle Proteine einer Zelle auf einmal. Die 2D-PAGE ist zudem für viele Proteine nicht sensitiv genug und für die Proteomics-Analyse ungeeignet, da sie keine Interaktionen von Proteinen einer Zelle erfassen kann.

Alle vorgenannten Verfahren und Methoden sind zudem für eine in der Wirkstoff-Entwicklung mehr und mehr gefragte Automatisierung ungeeignet.

5

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Identifizierung von zellulären interagierenden Partnern für die Proteom-Analyse zur Verfügung zu stellen, das eine schnelle, preiswerte und zuverlässige Analysemethode zur Identifizierung von zellulären interagierenden Partnern darstellt und sich ohne große Probleme automatisieren läßt.

10 Diese Aufgabe wird durch die in Anspruch 1 angegebenen Merkmale gelöst.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur massenspektrometrischen Identifizierung von Bindungspartnern mit positionsspezifischen Arrays, wird auf ein Trägermaterial mittels positionsspezifisch aufgebrachter kleiner Volumina von Reaktionspartnern ein positionspezifischer Ligat-Array herstellt, wobei man schrittweise mindestens zwei aufeinander folgende Reaktionen ausführt. Das auf dem Trägermaterial fixierte positions-spezifische Ligat-Array mit einem Gemisch von Liganden inkubiert, anschließend nicht an das Ligat-Array gebundene Liganden entfernt und der/die an das Ligat-Array gebundene/n Ligand/en weiter mittels Massenspektrometrie charakterisiert.

15 30 Überraschenderweise konnte gefunden werden, daß die Kombination von Inkubation eines Liganden-Gemisches mit einem auf einem Träger gebundenen positions-spezifischen Array und anschließender Analyse der gebundenen Proteine mittels Massenspektrometrie die oben genannten Probleme des Standes der Technik vermeidet und eine preiswerte, schnelle, robuste und zuverlässige Methode zur Proteom-

35

Analyse darstellt. Weiterhin kann dieses Verfahren ohne große Probleme vollständig automatisiert werden, so daß eine hoher Probendurchsatz bei geringen Kosten gewährleistet ist.

5

Beim erfindungsgemäßen Verfahren ist es bevorzugt, daß das Ligat-Array ein Peptidarray, Array aus Nucleinsäuren oder anderen organochemischen Verbindungen oder über Fragmentkondensation von Peptiden erhaltenes Proteinarray 10 ist. Es ist insbesondere bevorzugt, daß das Gemisch von Liganden ein Zelllysat, Gemisch von Nucleinsäuren oder Gemisch von anderen organochemischen Verbindungen ist.

15

Es werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zunächst aufwendige Aufbereitungsschritte der aufgeschlossenen Zellen vermieden, da in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens alle Proteine einer Zelle ohne Reinigung auf einmal analysiert werden können. Die Verwendung von positions-spezifischen Arrays erlaubt 20 zudem eine Standardisierung des Verfahrens. Das für das Verfahren verwendete Trägermaterial für das Peptidarray kann fest oder flexibel sein und besteht bevorzugterweise aus Harzbeads, Polymerpins oder Chipmaterial. Besonders bevorzugt ist es, wenn das verwendete Trägermaterial aus 25 einer Polymermembran besteht, wie zum Beispiel einer Nylon-, Cellulose- oder modifizierten Cellulose oder modifizierten Polypropylenmembran.

30

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als Zelllysat normalerweise ein Vollzelllysat verwendet, es kann jedoch auch ein durch Zentrifugation, Filtration oder andere geeignete Verfahren vorfraktioniertes Vollzelllysat verwendet werden. Das Zelllysat kann ein Lysat aus prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen sein, es 35 können auch transformierte oder transgene Zellen verwendet werden.

Besonders bevorzugt ist es, wenn als Zelllysat ein  $^{35}\text{S}$ -Methionin-markiertes oder  $^{35}\text{S}$ -Cystein-markiertes Lysat verwendet wird.

5

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, daß das Zelllysat zusammen mit mindestens einem definierten Cofaktor verwendet wird. Als Cofaktoren können zum Beispiel Proteine 10 oder Metallionen verwendet werden.

Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Verfahren ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, daß die für das Peptidarray verwendeten Peptide zwischen 3 und 30 Aminosäuren lang sind. 15 Bevorzugt sind Peptide zwischen 6 und 15 Aminosäuren Länge, besonders bevorzugt sind Peptide von 13 Aminosäuren Länge. Besonders bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Ausführungsform, bei der die für das Peptidarray verwendeten Peptide über einen Linker an das Trägermaterial fixiert 20 sind. Dieser Linker kann Protease-sensitiv oder chemisch spaltbar sein.

Ein weiteres bevorzugtes erfindungsgemäßes Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß das verwendete Peptidarray 25 ein SPOT-Peptidarray ist.

Nicht an das Peptidarray gebundenes Protein kann erfindungsgemäß mittels Waschen mit einem Puffer oder durch Fällung entfernt werden.

30

Eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, daß das/die an das Peptidarray gebundene/n Protein/e vor der Proteasebehandlung vom Trägermaterial gelöst und anschließend einer Gelelektrophorese unterzogen wird/werden.

Die Charakterisierung der Protease-behandelten Proteine oder der Liganden oder abgespaltenen Liganden erfolgt erfundungsgemäß mittels Massenspektrometrie, bevorzugt mit tels MALDI oder ESI Massenspektrometrie, ganz besonders 5 bevorzugt mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie.

Ein besonderer Vorteil des erfundungsgemäßen Verfahrens ist die Tatsache, daß sich alle Schritte der Proteomics-Analyse vollständig automatisieren lassen. Ein weiterer 10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Roboter zur Durchführung des erfundungsgemäßen Verfahrens.

Die SPOT-Synthese (R. Frank, Tetrahedron 1992, 48, 9217-9232, DE-OS 4027675) ist eine etablierte Methode zur 15 ortsadressierten Synthese von Peptiden und deren Screening auf Bindung zu Proteinen (A. Kramer, J. Schneider-Mergener, Meth. Mol. Biol. 1998, 87, 25-39, A. Kramer, A. Schuster, U. Reineke, J. Schneider-Mergener, METHODS (Comp. Meth. Enzymol.) 1994, 6, 388-395.). Neben Peptiden 20 sind auf diese Weise auch andere Verbindungsklassen wie z.B. Peptoide (T. Ast, N. Heine, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, H. Wenschuh, Tetrahedron Lett. 1999, 40, 4317-4318) zugänglich.

25 Das erfundungsgemäße Verfahren ist mit den unterschiedlichsten Ligaten anwendbar. Geeignete Ligate, welche sich zu den erfundungsgemäßen positionsspezifischen Ligat-Arrays aufbauen lassen, sind beispielsweise, ohne auf diese beschränkt zu sein, Peptide,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Peptide, Peptoide, (Oligo-)Harnstoffe, (Oligo-)Thioharnstoffe, 30 (Oligo-)Carbamate, (Oligo-)Carbonate, Triazine, (Oligo-)Sulfonamide, Azatide sowie Glyco-Konjugate der vorgenannten Verbindungen, (Oligo-)Saccharide, PNA (Peptide-Nucleic-Acid), Hydantoine, 2-Piperazone, 35 Isochinoline, Benzodiazepine, pharmakologisch aktive Verbindungen und Wirkstoffe (beispielsweise Antidepressiva,

β-Blocker, cardiovascular aktive Verbindungen,  
Antarrhythmika, Antihistaminika, Tranquillantien, H<sub>2</sub>-  
Blocker, Acidose-Therapeutika, Aminoglycosid-Antibiotika,  
Amoebicide, Anästhetika, Analgetica, Androgene, Antacida,  
5 Anthelmintica, Antiallergika, Antiandrogene, Antibiotika,  
Anticholinergika, Anticoagulantien, Anticonvulsiva, Anti-  
dote, Antiemetica, Antifibrinolytika, Antihypertensiva,  
Antihypertonica, Antihypotonica, Antimalariamittel, An-  
timycotica, Antiparkinson-Mittel, Antiphlogistika, Antip-  
soriatica, Antipyretica, Antirhematica, Antiscabiosa, An-  
tiseborrhoica, Antiseptica, Antitumormittel, Antitussiva,  
10 Atemanaleptika, Bronchiolytika, Calciumantagonisten, Car-  
diotonica, Cerebrotonica, Chemotherapeutica, Cholesterin-  
senker, Cytostatika, Dehydropeptidase-Inhibitoren, Des-  
infizientia, Diagnostika, Diuretica, Expektorantien, Fi-  
brinolytika, Fungicide, Gestagene, Glucocorticoide, Gonadorelin  
15 (LH-RH)-Agonisten, Hypnotica, Immunstimulantien,  
Immunsuppressiva, Keratolytika, β-Lactamase-Inhibitoren,  
Laxativa, Lebertherapeutika, Lichtschutzmittel, Lipidsen-  
ker, LipolyseInhibitoren, Lipotropica, Lokalanästhetika,  
20 Malariamittel, Miotica, Muskelrelaxantien, Mydriatica,  
Neuroleptika, Neurotropica, Ophthalmologika, Parasympa-  
thicomimetika, Prostatatherapeutika, Protelytika, Phy-  
chotropika, Rhinologika, Röntgenkontrstmittel, Sedativa,  
25 Spasmolytika, Spermatocide, Sympathicomimetika, Throm-  
bocyten-Aggregationshemmer, Trypsin-Inhibitoren, Tuberku-  
lostatika, Ulcusterapeutika, Vasoconstrictoren, Vasodi-  
latatoren, Venemittel, Virustatica, Vitamine) oder Natur-  
stoffe (beispielsweise Steroide, Terpene, Alkaloide, Fla-  
30 vonoide, Fettsäuren, Lipide, Pheromone, Riechstoffe, An-  
tikörper, Hormone, Gifte, Abwehr-, Signal- und Wuchsstoffe,  
Enzyme) und andere als die oben genannten organoche-  
mischen Verbindungen.

35 Die Erfindung soll anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben werden.

- Dabei zeigt Figur 1, daß  $^{35}\text{S}$ -markierte Proteine an immobilisierte Peptide binden, welche die intrazelluläre EPOR-Domäne repräsentieren. Cellulose-gebundene überlappende Peptide (13mere, 10 Aminosäuren Überlappung), die die gesamte intrazelluläre Domäne des EPOR abdecken (Peptid Nummer 1 repräsentiert Aminosäuren 248-260, Nummer 2 Aminosäuren 251-263 usw; für Sequenzinformation siehe Figur 3), wurden mit Lysaten von EPO-stimulierten 5 (A) oder unbehandelten (B) J2E erythroleukämischen Zellen nach Markierung mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin/Cystein inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch Autoradiographie detektiert.
- 10 15 Figur 2 zeigt eine in vitro Translation von cDNA's, die für verschiedene Signalmoleküle kodieren. Die cDNA's wurden subkloniert und einer in vitro Translation unter der Verwendung von T7 und T3 Polymerase wie beschrieben unterzogen (eine von beiden Reaktionen diente als interne 20 Kontrolle). Ein Aliquot des Reaktionsgemisches wurde mittels PAGE getrennt. Radioaktive Proteine wurden durch Autoradiographie nach fluorographischer Verstärkung detektiert. Das Molekulargewicht ist auf der rechten Seite angegeben (in kDa).
- 25 30 Figur 3 zeigt ein Bindungsmuster von JAK2, SHP1 und PLC $\gamma$  an immobolisierte Peptide der EPOR-Sequenz. (A) Sequenzen von Cellulose-gebundenen überlappenden Peptiden. (B) Radioaktiv markierte Proteine wurden mit den immobilisierten Peptiden wie beschrieben inkubiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. (C) Die Sequenz der gesamten 35 intrazellulären Domäne ist gezeigt und Regionen mit den stärksten radioaktiven Signalen sind für die entsprechenden angegebenen Proteine mit Kästen markiert.

Figur 4 zeigt ein MALDI Mass Fingerprint des Spots E2 (Thyrosin-Protein-Kinase JAK3).

Figur 5 zeigt die MS-Fit-Rechnung des Spots E2 aus Figur  
5 4 dar

Figur 6 zeigt die  $^{35}\text{S}$ -Aktivität nach Inkubation einer Bibliothek aus 1600 Dipeptoiden mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiertem Zell-Lysat.

10

Identifizierung von Bindungspartnern des Erythropoetin-Rezeptors mit positions-spezifischen Peptidarrays und Massenspektrometrie

Um potentielle intrazellulär interagierende Partner des Erythropoetin Rezeptors (EPOR) zu identifizieren, wurden Zelllysate von Erythropoetin (EPO) stimulierten und nicht-stimulierten Zellen mit Cellulosemembran-gebundenen EPOR-spezifischen Peptidscans inkubiert, der Proteingehalt verschiedener ausgewählter Spots einer Gelelektrophorese unterzogen und distinkte Banden mittels Massenspektrometrie analysiert.

In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, daß Inkubation eines Sets von an eine Cellulosemembran gebundenen überlappenden Peptiden, die vom cytoplasmatischen Teil des 55 kDa Tumor-Nekrosisfaktor Rezeptor (TNF-R55) stammten, mit einem  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten Jurkat Zelllysat zu einer Bindung von zellulären Proteinen an distinkte Spots des TNF-R Scans führte. Die durch diesen Ansatz hervorgehobenen TNF-R Regionen entsprachen exakt den vorher als für die verschiedenen biologischen Funktionen dieses Rezeptors verantwortlich beschriebenen intrazellulären TNF-R Regionen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß ein durch das Hefe „two-hybrid“ System neu entdecktes Protein FAN spezifisch mit distinkten Spots des TNF-R Scans interagierte, der einer Region entsprach, die für

die Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase bekannt ist. Die Verwendung der zwei Techniken führte deshalb zu einer relativ schnellen Identifizierung eines neuen an der TNF Signalkaskade beteiligten Proteins. Dennoch war 5 dieser Prozeß relativ arbeitsaufwendig, da eine große Zahl von durch das „two-hybrid“ System erhaltenen cDNA Klonen (>50) auf eine Bindung an eine bestimmte Region des Rezeptors hin zu charakterisieren waren.

10 Um einen direkteren Weg zur Identifizierung von interagierenden Partnern in der zellulären Signalkaskade unter Umgehung des Hefe „two-hybrid“ Systems zu untersuchen, wurde versucht, Proteine direkt von den Spots zu erhalten und diese sie durch tryptischen Verdau, Massenspektrometrie und Datenbankanalyse zu analysieren. Um diesen neuen experimentellen Ansatz zu testen, wurde in diesem Fall 15 ein Cellulosemembran-gebundener von EPO-R stammender Peptidscan synthetisiert, der dann mit EPO-ansprechenden J2E Erythroleukämischen Zelllysaten inkubiert wurde, die mit 20  $^{35}\text{S}$ -Methionin/Cystein markiert waren (siehe Figur 1). Es konnte eine Bindung an distinkte Rezeptor-spezifische Spots beobachtet werden. Überraschenderweise gab es einen klaren Unterschied in der Bindung bei der Verwendung eines Lysats einer mit EPO stimulierten J2E Zelle.

25 Die intrazellulären Domänen der Cytokinrezeptoren sind bekannterweise aus strukturellen Modulen für die Bindung von spezifischen zellulären Signalproteinen zusammengesetzt. Es wird vermutet, daß die Fähigkeit, mit bestimmten Targets zu interagieren, Kompetenz und Spezifität bei 30 der Regulation der Genexpression bewirkt. Um eine neue Strategie zur Analyse der Interaktionen zwischen zellulären Proteinen und Peptiden, welche die intrazelluläre Domäne des EPO Rezeptors repräsentieren, zu untersuchen, 35 wurden durch die Spot-Synthese hergestellte Cellulose-gebundene Peptide angewendet. Zelluläre Proteine der

Erythroleukämischen EPO-ansprechenden Zelllinie J2E wurden in vivo durch die Inkorporation von  $^{35}\text{S}$ -Aminosäuren markiert und wie beschrieben mit den immobilisierten Peptiden inkubiert. Figur 1 zeigt die Bindungsmuster von Zelllysaten aus mit EPO stimulierten oder unbehandelten Zellen. Es konnten starke Protein/Peptid Interaktionen hauptsächslich mit Peptiden beobachtet werden, die der proximalen Membranregion des EPOR entsprachen. Die Stimulation mit EPO erhöht offensichtlich die Affinität einiger Proteine zu bestimmten Peptiden, hingegen bleibt die Mehrheit der Interaktionen unverändert.

Um die Bindungseigenschaften einzelner Proteine zu untersuchen, für die bekannt war, daß sie mit dem EPOR interagieren, wurde eine Auswahl von in vitro translatierten Proteinen in demselben System verwendet. Das Vorhandensein und Reinheit von einzelnen radioaktiven Proteinen der erwarteten Größe wurde durch PAGE überprüft (Figur 2). Nachfolgende Versuche wurden unter der Verwendung von Präparationen durchgeführt, die eine radioaktiv markierte Proteinspezies enthalten um sicherzustellen, daß alle gefundenen Interaktionen spezifisch sind.

Das Bindungsmuster von drei Signalmolekülen, die bekanntermaßen am EPOR-Komplex beteiligt sind, ist in Figur 3 dargestellt. Die markierten Proteine interagieren spezifisch mit den von EPOR stammenden Peptiden. JAK2 wird als die entscheidende Kinase betrachtet, die EPOR-induzierte Signalaktivitäten vermittelt und für das Fehlen jeglicher intrinsischer Enzymaktivitäten in der intrazellulären Domäne substituiert. JAK2 bindet vornehmlich an die sehr Membran-proximalen Aminosäuren und zusätzlich an Peptide, die einer distalen Region des Rezeptors entsprechen.

Die Membran-proximale Bindung stimmt mit den Daten über EPOR-Mutanten überein, die wiederholt gezeigt haben, daß

JAK2 mit stark carboxyterminal truncierten Rezeptorformen Immunopräzipitiert. Zusätzlich beseitigen Mutationen in der Region nahe der Membran die JAK2-Bindung und -Funktion gleichermaßen. Eine zweite Interaktionsstelle 5 wurde in einem mehr distalen Teil des Rezeptors identifiziert. Interessanterweise bindet SHP1, eine Tyrosinphosphatase, die bekannterweise funktionell an der EPO-induzierten Signalkaskade beteiligt ist, mit hoher Affinität an dieselben Peptide, die Aminosäuren 386-398 und 10 ebenso an die proximale Membran-Aminosäuresequenz wie für JAK2. Es wurde früher gezeigt, daß die Phosphatase, welche die SH2-Domäne enthält, an das Phosphotyrosin 429 im carboxyterminalen Teil des aktivierte Rezeptors bindet. Die hier vorgelegten Ergebnisse wurden mit unphosphorylierten Peptiden erhalten, obwohl eine Phosphorylierung 15 durch eine Kinase, die in dem für die in vitro Transkription verwendeten Reticulocytenlysat vorliegen könnte nicht vollständig auszuschließen ist. Das Bindungsmuster zeigt, daß vielleicht zusätzliche Interaktionen unabhängig von einer Phosphorylierung existieren. JAK2 und SHP1 wurden 20 als funktional zusammenhängend beschrieben und interagieren ebenso in in-vitro Experimenten. Wie oben genannt, enthält das für die in vitro Translation verwendete Lysat zusätzliche nichtradioaktive Proteine, die in der Bindungsreaktion stören können. Dies könnte eine Erklärung 25 dafür sein, daß JAK2 an die bevorzugte SHP1 Stelle bindet und umgekehrt. Wenn Bindung von „kaltem“ JAK2 und SHP1 an die Peptide annehmen, kann radioaktives Jak2 und SHP1 wechselwirken und dadurch indirekt an die Peptide gebunden werden. Die genaue Stelle der Interaktion für PLC $\gamma$  30 und den EPOR ist bisher noch nicht beschrieben. Ob PLC $\gamma$ -Bindung eine Bindung an spezifische Tyrosine innerhalb des EPOR benötigt, bleibt festzustellen. Unsere Daten deuten auf eine Bindungsdomäne in der Nähe des C-Terminus 35 hin, die möglicherweise zu der vorgeschlagenen SH2-Phosphotyrosin Interaktion führt.

Um den oben beschriebenen Ansatz weiter zu vertiefen, wurde untersucht, ob es möglich ist, Proteine zu identifizieren, die an Peptide gebunden sind, welche von der Rezeptorsequenz stammen. Dazu wurden Peptide verwendet, die eine starke Interaktion mit zellulären Proteinen zeigten, mit Zelllysaten inkubiert und die Proteine nach ausgiebigem Waschen wie beschrieben eluiert. Nach Trennung auf Acrylamid wurden diese Proteine gefärbt, in-Gel enzymatisch verdaut, die Fragmente isoliert und einer Massenspektrometrie unterzogen. Die Reinheit und Menge der in den Gelbanden vorhandenen Proteine war für absolut ausreichend, um die aus den Peptidspots erhaltene Proteinspezies über Peptid Mass Fingerprints zu identifizieren. Einige dieser Proteine sind für Funktionen in Zusammenhang mit EPOR nicht beschrieben. Zum Beispiel wurde die Janus Kinase JAK3, von der bekannt ist, daß sie an IL-2, 4, 7, 9, 15 Signalkaskaden beteiligt ist, als ein Bindpartner von Peptiden aus der EPOR-Sequenz identifiziert (Figur 4 und Figur 5). Weitere Untersuchungen über die funktionelle Relevanz der identifizierten Proteine folgen.

#### In-Gel-Verdau

Ein von Shevchenko et al. (1) verwendetes und leicht modifiziertes In-Gel-Verdau Verfahren wurde angewendet. Die Proteinspots wurden ausgeschnitten, mit 50% Acetonitril in 25 mM Ammoniumbicarbonat, durch Dehydrierung in Acetonitril geschrumpft und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Die Gelstücke wurden 10 µl 5 mM Ammoniumbicarbonat mit 300 ng Trypsin aufgequollen. Nach 60 min, wurde 5 µl 5 mM Ammoniumbicarbonat hinzugefügt, um die Gelstücke während des tryptischen Verdau feucht zu halten (37°C, über Nacht). Um die Peptide zu extrahieren, wurden 15 µl 0,5%

Trifluoressigsäure (TFA) in Acetonitril hinzugefügt und die Proben für 5 min beschallt. Die Peptide wurden direkt aus der abgetrennten Flüssigkeit mittels MALDI Massenspektrometrie analysiert.

5

MALDI Massenspektrometrie und Datenbanksuche

Die massenspektrometrischen Messungen wurden auf einer Voyager-DE STR BioSpectrometrie Workstation MALDI-TOF Massenspektrometer (Perseptive Biosystems, Inc.) durchgeführt. 2 µl der Analyselösung wurde mit 2 µl alpha-Cyano-4-hydroxyzimtsäure (4-HCCA) Matrixlösung, bestehend aus 10 mg Matrix in 1 ml 0,3% TFA in Acetonitril-Wasser (1:1, v/v) gelöst, gemischt. Von der erhaltenen Mischung wurde 1 µl auf die Probenplatte aufgebracht. Die Proben wurden bei Raumtemperatur (24°C) luftgetrocknet. Alle Messungen wurden im Reflektionsmodus bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV, 70% Gitterspannung und einer Verzögerung von 200 ns durchgeführt. Jedes erhaltene Spektrum war das Mittel aus 256 Laserbeschüssen. Die Massenspektren wurden unter der Verwendung bekannter Trypsinfragmente als interne Standards kalibriert. Die bestimmten Peptidmassen wurden mit theoretischen Massen von Proteinen aus der NCBInr.11.09.98 Datenbank unter der Verwendung des Suchprogramms MS-FIT verglichen

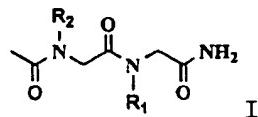
(<http://falcon.ludwig.ucl.ac.uk/msfit.htm>).

25

Bestimmung von Bindungspartnern einer Peptoid-Bibliothek

Eine Bibliothek aus 1600 Dipeptoiden (Membrangröße: 9 cm x 9 cm) der allgemeinen Formel I

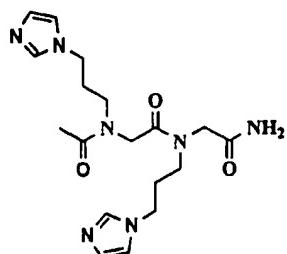
30



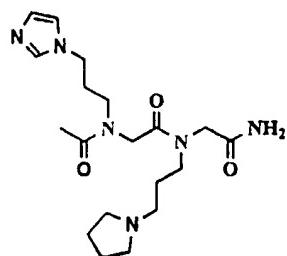
worin R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> für beliebige Reste stehen,

wurde mit einem  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiertem Zell-Lysat inkubiert. Die Positionen A, B und C, stellen dabei die folgenden Verbindungen dar:

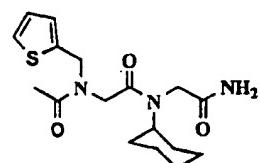
Dipeptoid A



Dipeptoid B



Dipeptoid C



## Patentansprüche

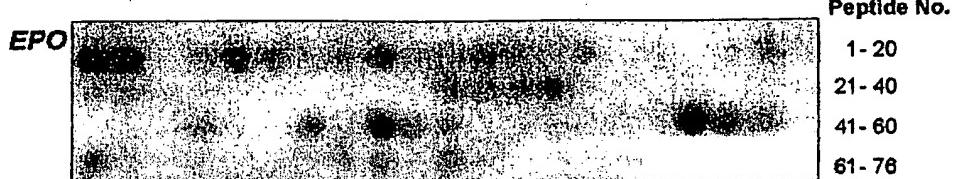
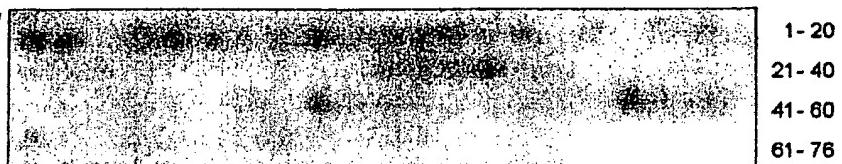
1. Verfahren zur massenspektrometrischen Identifizierung  
5 von Bindungspartnern mit positionsspezifischen Ar-  
rays, wobei man  
auf ein Trägermaterial mittels positionsspezifisch  
aufgebrachter kleiner Volumina von Reaktionspartnern  
ein positionspezifischer Ligat-Array herstellt, wobei  
10 man schrittweise mindestens zwei aufeinander folgende  
Reaktionen ausführt,  
das auf dem Trägermaterial fixierte positions-  
spezifische Ligat-Array mit einem Gemisch von Ligan-  
den inkubiert,  
15 anschließend nicht an das Ligat-Array gebundene Li-  
ganden entfernt und  
der/die an das Ligat-Array gebundene/n Ligand/en wei-  
ter mittels Massenspektrometrie charakterisiert.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß das Ligat-Array ein Peptidarray, Array aus  
Nucleinsäuren oder anderen organochemischen Verbin-  
dungen oder über Fragmentkondensation von Peptiden  
erhaltenes Proteinarray ist.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß das Gemisch von Liganden ein Zelllysat, Gemisch  
von Nucleinsäuren oder Gemisch von anderen organoche-  
mischen Verbindungen ist.
- 30 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  
man auf einem Trägermaterial mittels positionsspezi-  
fisch aufgebrachter kleiner Volumina von Reaktions-  
partnern ein positionspezifischer Peptidarray her-  
stellt,  
35 das auf das Trägermaterial fixierte positions-

spezifische Peptidarray mit einem Zelllysat inkubiert,  
anschließend nicht an das Peptidarray gebundenes Protein entfernt und  
5 das/die an das Peptidarray gebundene/n Protein/e nach Proteasebehandlung mittels Massenspektrometrie charakterisiert.

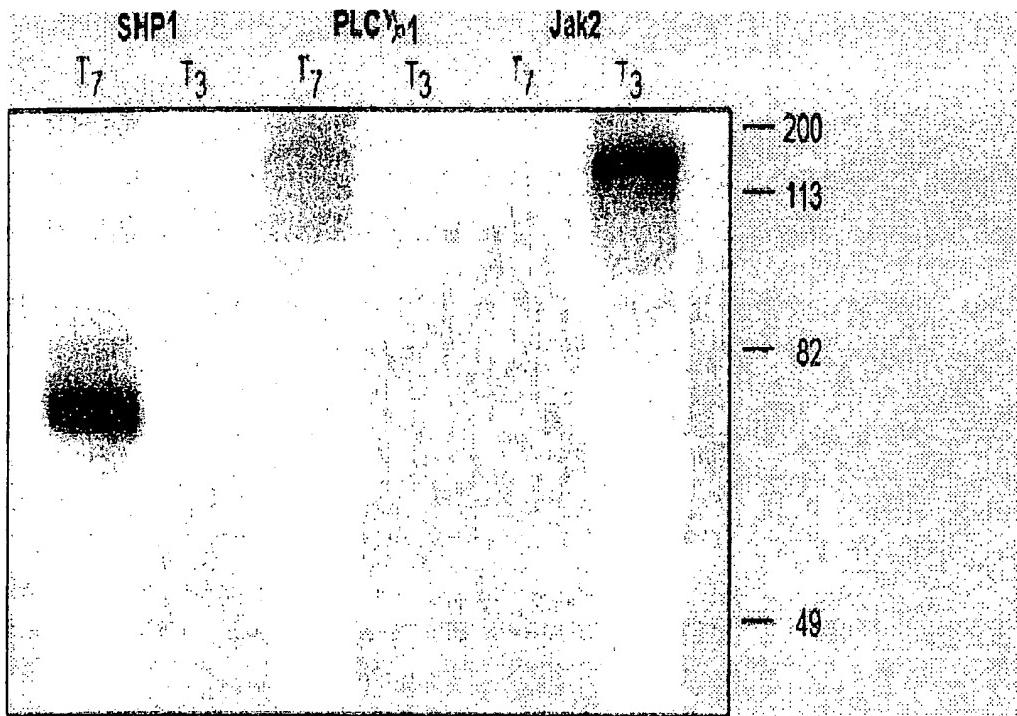
- 10 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das verwendete Trägermaterial fest oder flexibel ist.
- 15 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das verwendete Trägermaterial aus Harzbeads, Polymerpins oder Chipmaterial besteht.
- 20 7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das verwendete Trägermaterial aus einer Polymermembran besteht.
- 25 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das verwendete Trägermaterial aus einer Nylon-, Cellulose-, modifizierten Cellulose- oder modifizierten Polypropylenmembran besteht.
- 30 9. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als Zelllysat ein Vollzelllysat verwendet.
- 35 10. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als Zelllysat ein durch Zentrifugation, Filtration oder andere geeignete Verfahren vorfraktioniertes Vollzelllysat verwendet.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Zelllysat ein Lysat aus prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen verwendet.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als Zelllysat ein Lysat aus transformierten Zellen verwendet.  
5
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Zelllysat ein <sup>35</sup>S-Methionin- oder <sup>35</sup>S-Cystein-markiertes Lysat verwendet.  
10
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man das Zelllysat zusammen mit mindestens einem definierten Cofaktor verwendet.  
15
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man Cofaktoren Proteine oder Metallionen verwendet.  
16. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,  
20 daß die für das Peptidarray verwendeten Peptide zwischen 3 und 30 Aminosäuren lang sind.  
25
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Peptidarray verwendeten Peptide zwischen 6 und 15 Aminosäuren lang sind.  
30
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Peptidarray verwendeten Peptide 13 Aminosäuren lang sind.  
19. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß die für das Ligat-Array verwendeten Ligate über einen Linker an das Trägermaterial fixiert sind.  
35
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker Protease-sensitiv ist.

21. Verfahren nach Anspruch 19 dadurch gekennzeichnet,  
daß der Linker chemisch spaltbar ist.
- 5 22. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,  
daß der verwendete Peptidarray ein SPOT-Peptidarray  
ist.
- 10 23. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß die weitere Charakterisierung der Liganden mit-  
tels MALDI oder ESI Massenspektrometrie erfolgt.
- 15 24. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,  
daß man das nicht an das Peptidarray gebundene Prote-  
in mittels Waschen mit einem Puffer entfernt.
- 20 25. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,  
daß man das nicht an das Peptidarray gebundene Prote-  
in durch Fällung entfernt.
- 25 26. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,  
daß man das/die an das Peptidarray gebundene/n Prote-  
in/e vor der Proteasebehandlung vom Trägermaterial  
löst und anschließend einer Gelelektrophorese unter-  
zieht.
- 30 27. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,  
daß die Charakterisierung der Protease-behandelten  
Proteine mittels MALDI oder ESI Massenspektrometrie  
erfolgt.
28. Roboter zur Durchführung des Verfahrens nach einem  
der vorgenannten Ansprüche.

**Fig. 1****untreated****Fig. 2**

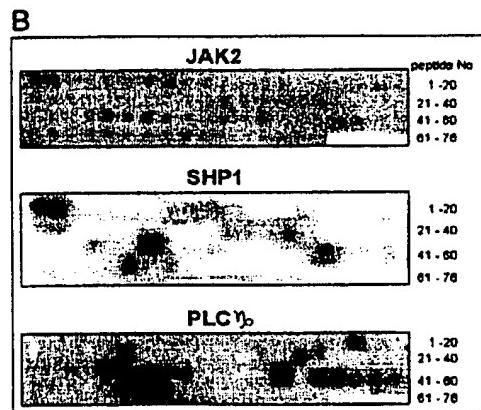
5.



**Fig. 3**

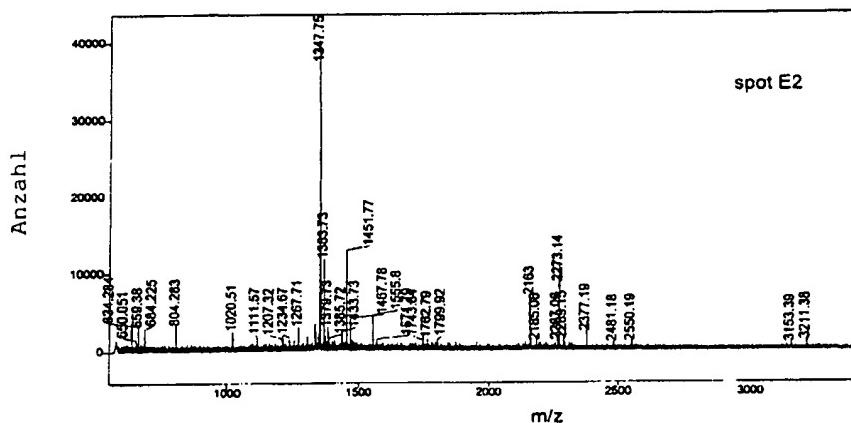
## Sequences of EPOR-derived peptides

| A | 1 SHRRRTLOOKIWPG<br>4 IWPGIPSPESF<br>7 SEFEGLFTTHKGN<br>10 HKGNFQLVLLQRD<br>13 LQRDGCLWWSPGS<br>16 SPGSSFPEDPPAH<br>19 PPAHLEVLSEPRWV<br>22 EPRWAVTQAGDPG<br>25 GDPGADDEGPILLE<br>28 PLLEPVGSEHAQDQ<br>31 HAQDTYLVLDKWL<br>34 DKWLLPRTPCSEN<br>37 CSENLSGPQGSVD<br>40 GSVDPVTMDEASE<br>43 EASETSSCPSDL<br>46 SDLASKRPEGTGS<br>49 ECTSPSSFEYITL<br>52 YTILDPSQLLC<br>55 LLCPRALPPELPP<br>58 ELPPTPPHLKYLY<br>61 KYLYLVVSDSGIS<br>64 SGISTDYSSGGSQ<br>67 GGSQGVHGDSSDG<br>70 SSDGPYSHPYENS<br>73 YENSLVPDSEPLH<br>76 DSEPLHPGYVACS | 2 RTLQQKIWPGIPS<br>5 GIPSPESFEGLF<br>8 EGLFTTHKGNFQL<br>11 NFQLVLLQRDGCL<br>14 DGCLWWSPGSF<br>17 SSFPEDPPAHLEV<br>20 HLEVLSEPRWAVT<br>23 WAVTOAGDPGADD<br>26 GADDEGPLLEPVG<br>29 EPVGSEHAQDQTYL<br>32 DTYLVLDKWLPR<br>35 LLPRTPCSENILSG<br>38 NLSGPQGGSVDPVT<br>41 DPVTMDEASETSS<br>44 ETSSCPSDLASKP<br>47 ASKPRPEGTSPSS<br>50 SPSSFEYTILDPS<br>53 LDPSQLLCPRAL<br>56 PRALPPELPP<br>59 PTTPPHLKYLV<br>62 YLVVSDSGISTDY<br>65 STDYSSGGSQGVH<br>68 QGVHGDDSDGPYS<br>71 GPYSHPYENS<br>74 SLVPDSEPLHPGY<br>76 DSEPLHPGYVACS | 3 QQKIWPGIPSPES<br>6 SPESEFEGLFTTH<br>9 FTTHKGNFQLWLL<br>12 LVLLQRDGCLWW<br>15 LWVSPGSSFPEDP<br>18 PEDPPAHLEV<br>21 VLSEPRWAVTQAG<br>24 TQAGDPGADEGP<br>27 DEGPLLEPVGSEH<br>30 GSEHAQDQTYLVD<br>33 LVLDKWLPRTPC<br>36 RTPCSENLSGPQGG<br>39 GPGGSVDPVTMDE<br>42 TMDEASETSSCP<br>45 SCPSDLASKP<br>48 PRPEGTSPSS<br>51 SFEYTILDPSQL<br>54 SSQLLCPRALP<br>57 LPPELPP<br>60 PHLKYLYLV<br>63 VSDSGISTDYSSG<br>66 YSSGGSQGVHGD<br>69 HGDSGDGPYSH<br>72 SHPYENSLVP<br>75 PDSEPLHPGYVAC |
|---|--|---|--|
|   |  |   |  |



C

| 248         | 258          | 268         |
|-------------|--------------|-------------|
| SHRRRTLOOKI | WPGIPSPES    | FEGLFTTHKG  |
| 278         | 288          | 298         |
| NFQLVLLQRD  | GCLWWSPGSS   | FPEDPPAHLE  |
| 308         | 318          | 328         |
| VLSEPRWAVT  | QAGDPGADDE   | GPLLEPVGSE  |
| 338         | 348          | 358         |
| HAQDTYLVLD  | KWLLPRTPCS   | ENLSGPQGSV  |
| 368         | 378          | 388         |
| DPVTMDEASE  | TSSCPDSLASKP | KPRPEGTSPSS |
| 398         | 408          | 418         |
| SFEYTILDPS  | SQLLCPRALP   | PELPPPTPHL  |
| 428         | 438          | 448         |
| KYLYLVVSDS  | GISTDYSSGG   | SQGVHGDSSD  |
| 458         | 468          | 478         |
| GPYSHPYENS  | LVPDSEPLHP   | GYVACS      |

**Fig.4****MALDI Massenfingerprint****Fig.5****MS-Fit-Untersuchungsergebnisse**

Drücken Sie stop in Ihrem Browser, um die MS-Fit-Rechnung vorzeitig abzubrechen

Proben Identifikationsnummer (Kommentar): spot E2  
 gesuchte Datenbasis (database): SwissProt.r 07.09.99  
 Molekulargewichtssuche (100000-140000 Da) wählt 25555 Einträge  
 Totaler pI-Bereich: 77419 Einträge  
 Spezies-Suche (MAMMALS) wählt 13799 Einträge  
 Kombinierte Molekulargewichts-, pI- und Spezies-Suche wählt 661 Einträge  
 MS-Fit-Rechnung wählt 1 Eintrag

In Betracht gezogene Modifikationen: [Oxidation von M]

| Minimale # zu vergleichender Peptide | Peptid-Massentoleranz (+/-) | verwendeter Eiweißspalter | Maximale # verfehlter Spaltungen | Cysteine modifiziert durch | Pepti-N-Terminus | Peptid-C-Terminus |
|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------|-------------------|
| 6                                    | 0.050 Da                    | Trypsin                   | 1                                | Acrylamid                  | Wasserstoff (H)  | Freie Säure (OH)  |

**Ergebniszusammenfassung**

| Reihenfolge | # (%) vergleichener Massen | Protein Molmasse (Da)/pI | Spezies | SwissProt.r 07.09.99 Zugangs- # Q63272               | Protein-Name |
|-------------|----------------------------|--------------------------|---------|--|--------------|
| 1           | 6/24 (25%)                 | 122561.6/6.25            | Ratte   | Tyrosin-Protein Kinase JAK3 (Janus Kinase 3) (JAK-3) |              |

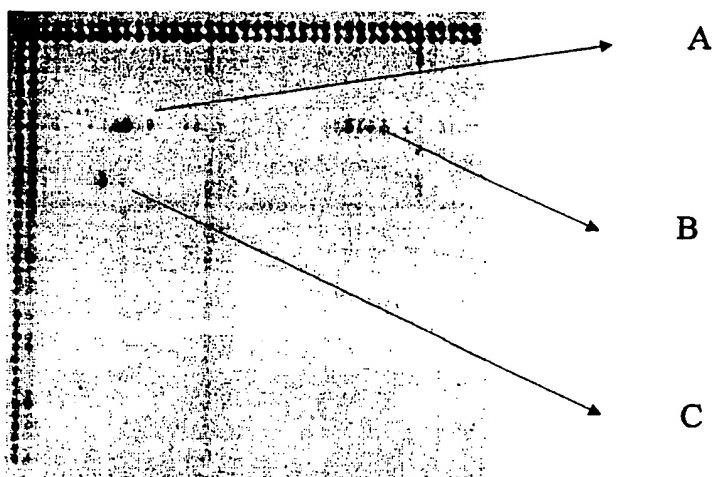
**Detaillierte Ergebnisse**

1. 6/24 Vergleiche (25%); 122561.6 DA; pI=6.25; Zugangs-# Q63272; RAT.; Tyrosin-Protein Kinase JAK3 (Janus Kinase 3) (JAK-3)

| m/z vorgeschlagen | MH+ verglichen | Delta (Da) | Start | Ende | Peptidsequenz (klicken um Fragment-Ion zu erhalten) | Modifikation |
|-------------------|----------------|------------|-------|------|---|--------------|
| 1111.5710         | 1111.5649      | 0.0061     | 882   | 891  | (K)YRGVSYGPR(O)                                     |              |
| 1111.5710         | 1111.5795      | -0.0085    | 941   | 949  | (R)CYHRDLAAR(N)                                     |              |
| 1267.7090         | 1267.7486      | -0.0396    | 176   | 186  | (R)KQAAQRPGELLK(S)                                  |              |
| 1451.7680         | 1451.7391      | 0.0289     | 896   | 907  | (R)LVMEYLPSGCLR(D)                                  |              |
| 1487.7790         | 1467.7340      | 0.0450     | 896   | 907  | (R)LVMEYLPSGCLR(D)                                  | 1 Meth-ox    |
| 1555.7980         | 1555.7790      | 0.0190     | 1     | 14   | (-)MAPPSEETPLISQR(S)                                |              |
| 1571.7950         | 1571.7739      | 0.0211     | 1     | 14   | (-)MAPPSEETPLISQR(S)                                | 1 Meth-ox    |

18 nicht verglichene Massen: 634.2840; 650.0511; 684.2254; 804.2833; 1020.5080; 1207.3170; 1234.6750; 1347.7480; 1363.7360; 1379.7290; 1385.7220; 1433.7280; 1743.8410; 1762.7880; 2481.1810; 2550.1900; 3153.3870; 3211.3790

**Fig. 6**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**